DOCUMENTS AFFÉRENTS

TRAVAUX PRATIQUES DE BACTÉRIOLOGIE VÉTÉRINAIRE

Dans la cadre du cours
d'Infectiologie vétérinaire
DMV 2120

FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE
UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
C.P. 5000, SAINT-HYACINTHE, QUÉ.

TABLES DES MATIÈRES

RÈGLES À SUIVRE AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

Le laboratoire de microbiologie exige une tenue exemplaire. Les manipulations doivent y être effectuées avec grand soin, gardant à l'esprit le danger toujours présent qu'entraîne l'utilisation de cultures microbiennes. Voici quelques règles que tout(e) étudiant(e) sérieux(se) devrait suivre, dans son intérêt, comme dans celui de ses confrères et consoeurs.

1. Le port du sarrau est de rigueur. Il devra toujours être propre et autant que possible, n'être utilisé qu'au laboratoire de microbiologie.

2. Ne jamais oublier de se laver les mains avant et après chaque séance de laboratoire.

3. Désinfecter les tables avant et après chaque période de travaux pratiques.

4. L'étudiant(e) aux cheveux longs verra à les attacher surtout lors d'un travail exigeant l'emploi d'un bec à gaz.

5. Éviter de porter ses doigts ou tout objet à sa bouche. Ne pas manger ou fumer au laboratoire.

6. Aviser immédiatement le professeur de tout accident (bris de verre, blessures, etc.).

7. Les instruments de travail contaminés ne seront déposés sur la table qu'après avoir été stérilisés par un flambage adéquat.

8. Éviter de laisser les brûleurs allumés inutilement afin de conserver une température ambiante confortable.

9. Afin d'éviter les contaminations extérieures, ne rien transporter hors du laboratoire (local 2964) sans autorisation.

10. Pendant les travaux pratiques, éviter de parler, notamment lorsque des ensemencements sont faits; éviter également de se déplacer inutilement.

11. Déposer tout matériel qui n'est plus utile, dans les récipients destinés à cette fin.

12. Étiqueter soigneusement les cultures avant de les porter à l'étuve.

PRÉLÈVEMENTS DE SPÉCIMENS

RÈGLES À SUIVRE
LORS DE PRÉLÈVEMENTS DE SPÉCIMENS

-Les spécimens doivent être prélevés du site (périphérie) de la lésion le plus tôt possible après le début de la maladie;

-Les spécimens doivent provenir d'un animal vivant sinon le plus tôt possible après sa mort;

-Il est important de prélever les spécimens aussi aseptiquement que possible pour éviter que des contaminants masquent la présence d'un pathogène significatif;

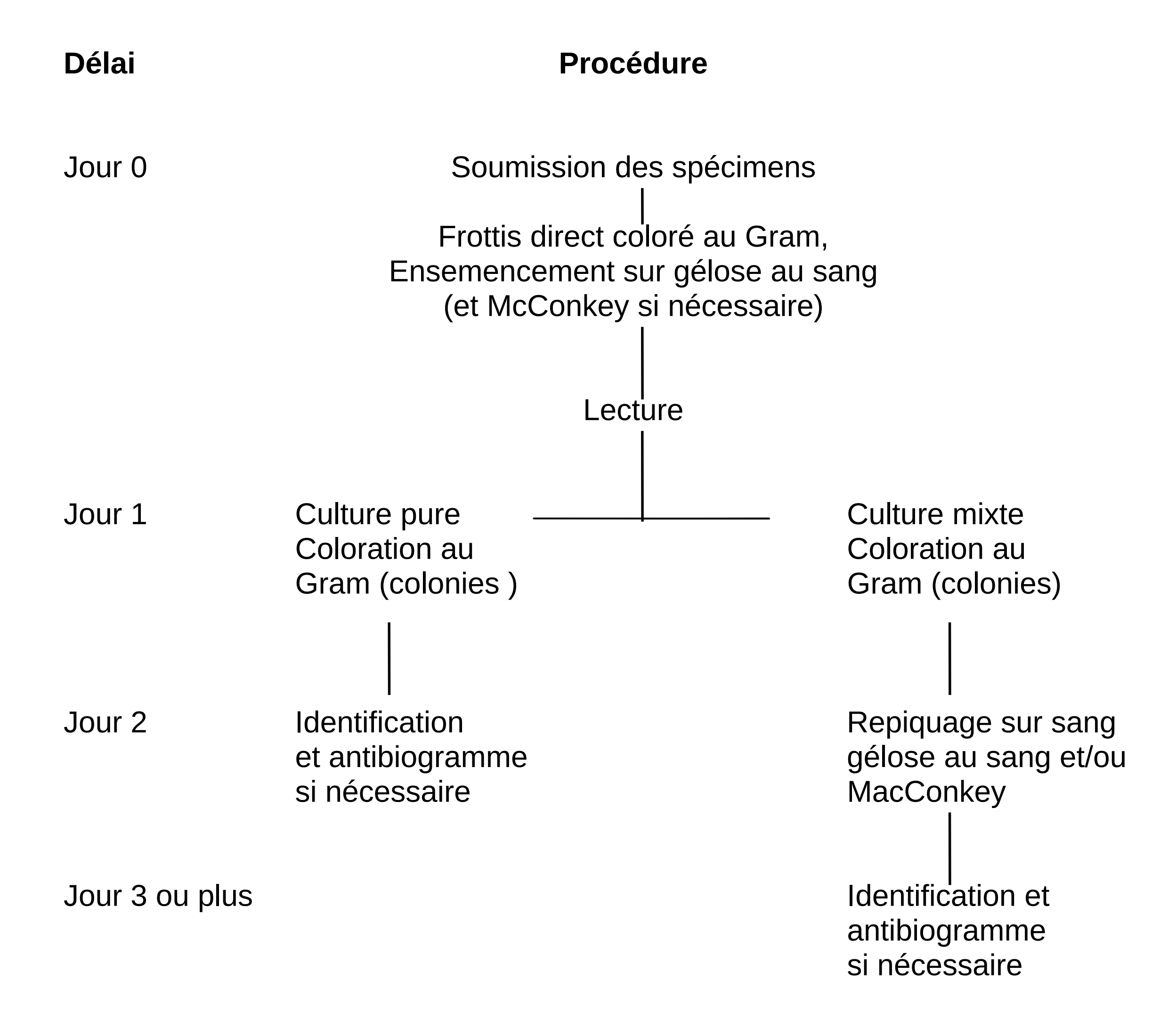
-Il faut toujours effectuer le prélèvement avant de débuter le traitement aux antibiotiques;

-Les spécimens doivent être mis dans des contenants individuels imperméables, bien identifiés et avec la date du prélèvement;

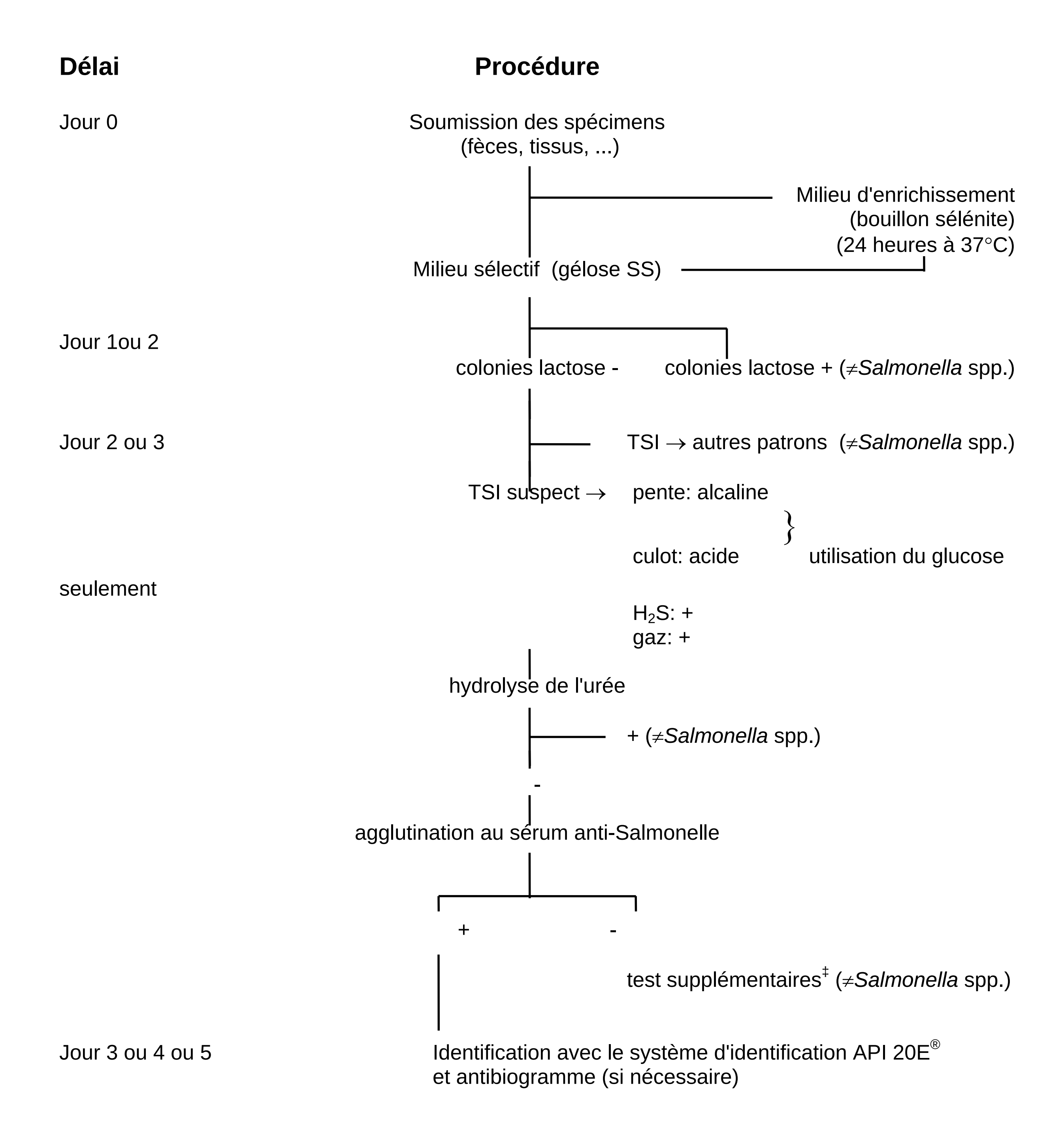
-Lorsque le délai entre le prélèvement et la réception du spécimen au laboratoire se prolongera, il faut prévenir la dessication du spécimen soit en utilisant un milieu de transport dans le cas d'un écouvillon, soit en prélevant une plus grande quantité de matériel pathologique ou en envoyant un morceau de tissu d'au moins 4cc; de plus, le spécimen devra être gardé à 4C mais non congelé.

Guide abrégé d'identification bactériologique

ISOLEMENT DE BACTÉRIES USUELLES
À PARTIR DE SPÉCIMENS



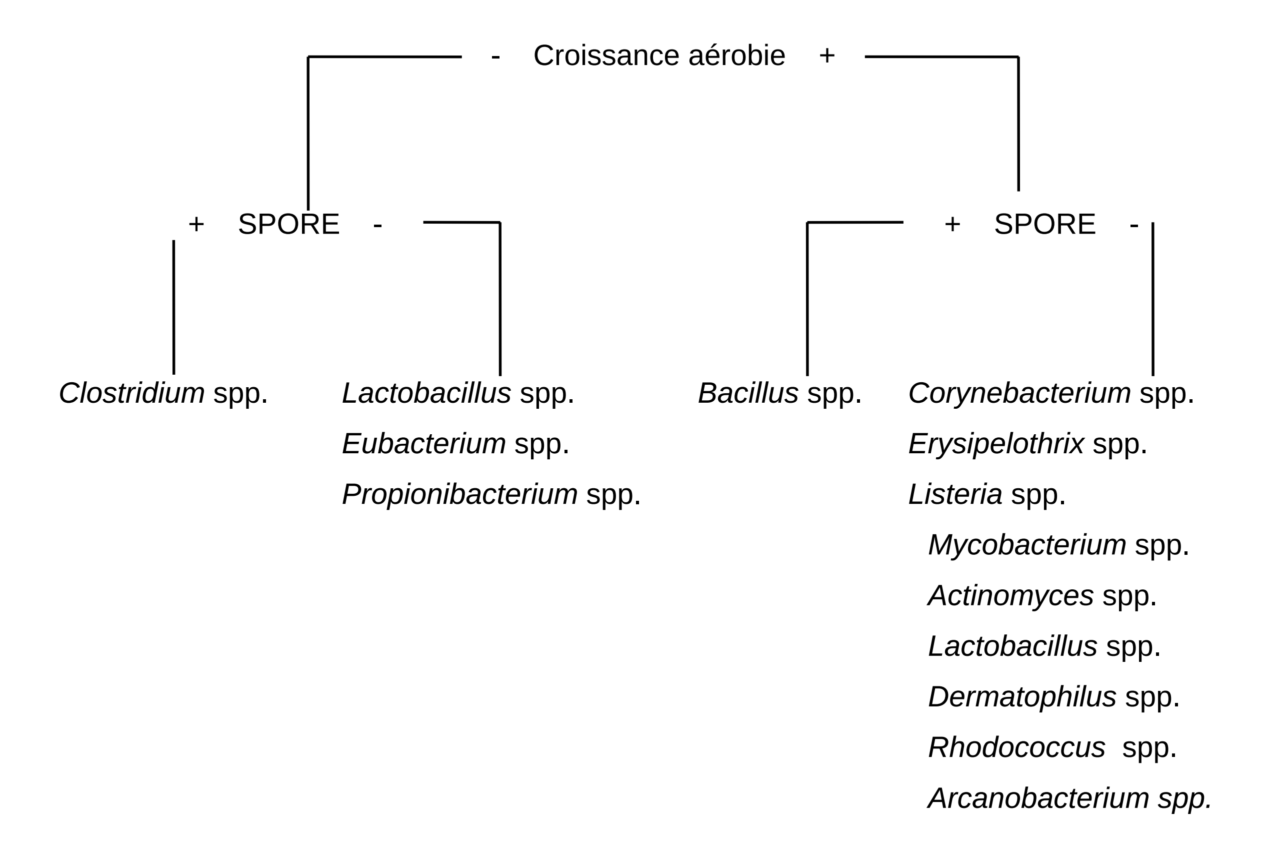
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE SALMONELLA



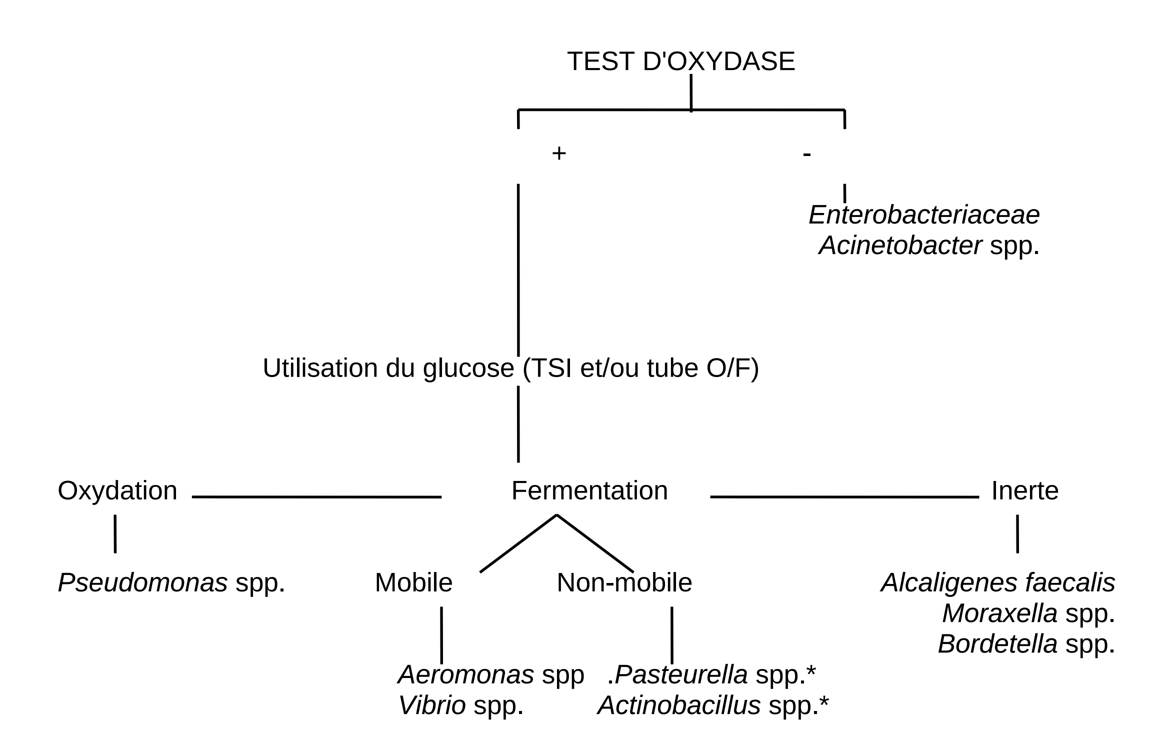
ISOLEMENT DE BACTÉRIES ANAÉROBIES

Délai	Procédure
Jour 0	Soumission des spécimens
	Frottis direct coloré au Gram Ensemencement de gélose réduite en oxygène
	Anaérobiose, 37°C (peut varier) pendant 48 heures
Jour 2	Lecture et repiquage en aérobiose, en anaérobiose et en CO_2
	24 - 48 heures
Jour 3 - 4	Éliminer les anaérobies facultatifs
Jour 4	Identification des anaérobies stricts . coloration de Gram . bile . indole . sensibilité aux agents antibactériens . micro-système d'identification pour les anaérobies (API 20A®)
Jour 6 - 8	Résultats

CLÉ D'IDENTIFICATION DE BACILLES À GRAM POSITIF



CLÉ D'IDENTIFICATION DES BÂTONNETS À GRAM NÉGATIF, AÉROBIES ET ANAÉROBIES FACULTATIFS



* fermentation faible

OBTENTION DE RéSULTATS À LA CULTURE APRES SOUMISSION D'UN SPECIMEN (jour 0) AU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC BACTÉRIOLOGIQUE

La recherche de ces micro-organismes doit être indiquée sur le rapport de bactériologie

	Temps minimum	Temps maximum[a]
Moisissures	5 jours	3 sem.
Leptospires	5 jours	4 sem.
Mycoplasmes	5 jours	2 sem.
Uréplasmes	2 jours	1 sem.
Brachyspira hyodysenteriae	2 jours	6 jours
Anaérobies	2[a] jours	8 jours
"Haemophilus somnus "	2 jours	1 sem.
Haemophilus spp.	2 jours	1 sem.
Actinobacillus pleuropneumoniae	1 jour	3 jours
Salmonella spp.	3 jours	5 jours
Listeria spp.	2 jours	6 sem.
Yersinia spp.	3 jours	6 sem.
Campylobacter spp.	2 jours	5 jours
Hémoculture	2 jours	1 sem.

[a] absence de croissance

Pour certaines espèces bactériennes (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. et *Streptococcus suis*) on peut effectuer également des analyses additionnelles de typage. Ces résultats sont obtenus de 7 à 14 jours à partir de la date d'envoi de l'isolat au laboratoire de référence.

Description des tests microbiologiques

TESTS MICROBIOLOGIQUES POUR IDENTIFICATION BACTÉRIOLOGIQUE

1. Agglutination rapide sur lame
2. Test de CAMP
3. Catalase
4. Citrate
5. Test d'agglutination au latex (PathoDx™)
6. Coagulase a. en tube
   b. sur lame
7. Esculine
8. Fermentation des sucres
9. Indole
10. Mobilité
11. Oxydase
12. Oxydation-Fermentation (OF)
13. Phénylalanine Désaminase (PD)
14. Triple Sugar Iron (TSI)
15. Uréase

1. Agglutination rapide sur lame (pour confirmation de l'identification d'un *Salmonella*)

L'agglutination est une réaction entre des cellules entières de micro-organismes et des agglutinines. Les agglutinines sont des anticorps pouvant provoquer des agglomérations de cellules. Se fixant à la surface des bactéries ou des cellules qui ont induit leur production, elles agissent comme agents de pontage entre celles-ci et les agglutinent. Les agglutinations ainsi produites se voient à l'oeil nu.

Technique

- A partir d'une colonie, transférer, à l'aide d'anse de platine, un inoculum à deux endroits sur une même lame de verre.

- Sur l'un d'eux ajouter une goutte de saline et sur l'autre ajouter l'antisérum.

- A l'aide d'un bout de bâtonnet de bois, bien mélanger la saline et l'inoculum. Si cette suspension bactérienne est bien homogène, non auto-agglutinante, bien mélanger l'antisérum et l'inoculum et observer la présence d'agglutination.

2. Test de CAMP

Principe

Déterminer si un organisme synthétise le facteur CAMP qui agit en synergie avec l'hémolysine B du staphylocoque, ce qui produit une lyse complète des érythrocytes à la jonction des deux organismes.

Technique

- Sur une gélose au sang, faire une strie de *Staphylococcus aureus* avec le fil de platine. Faire une deuxième strie avec la culture à identifier, de façon à ce qu'elle soit perpendiculaire à celle du *Staph. aureus.* Cette deuxième strie ne doit pas toucher la première, tout en étant très proche. Plusieurs cultures peuvent être soumises à l'épreuve sur la même gélose. Incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

Résultats

Réaction positive: zone typique d'hémolyse complète en forme de pointe de flèche, à la jonction des deux stries.

Réaction négative: aucune augmentation de l'hémolyse à la jonction des deux stries.

3. Catalase

Principe

Démontrer la présence de l'enzyme catalase.

Technique

- A l'aide d'une anse de platine, transférer à partir d'une gélose au sang, une partie d'une colonie si les colonies sont moyennes et plus d'une colonie si les colonies sont petites. Il faut parfois en prendre plus qu'une (sans gélose au sang car le sang contient de la catalase et donne une réaction positive) sur une lame de verre propre.

- Ajouter une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2, 30%) sur la colonie placée sur la lame.

Interprétation

Réaction positive: effervescence (bulles de gaz) immédiate dans le peroxyde.

Réaction négative: absence d'effervescence dans le peroxyde.

4. Citrate

Principe

Déterminer si la bactérie peut utiliser le citrate comme seule source de carbone.

Technique (milieu de Simmons)

A partir d'une croissance sur gélose, à l'aide d'une anse de platine, faire un prélèvement peu abondant afin d'inoculer en zigzaguant la surface de la pente du milieu gélosé.

Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Résultats

Réaction positive: croissance accompagnée d'un bleuissement du milieu.

Réaction négative: pas de croissance, le milieu reste vert.

5. Test d'agglutination avec particules de latex (PathoDx^{Tm})

Principe

La technique de coagglutination et d'agglutination avec particules de latex sont similaires. Le principe est le suivant: des anticorps de lapin, spécifiques des groupes de Lancefield A, B, C, D, F et G sont liés à des particules microscopiques de latex **(PathoDx^{Tm})**. Losqu'on mélange un échantillon contenant des streptocoques appartenant à l'un de ces groupes au réactif du groupe correspondant, les antigènes spécifiques se trouvant à la surface des streptocoques se lient aux anticorps spécifiques correspondants. Un réseau de coagglutination se forme, visible à l'oeil nu.

Technique sur colonies

- Ajouter 2 gouttes de Réactif 1 et de Réactif 2 dans un tube.
- Prélever de 1 à 4 colonies sur une gélose avec une anse ou un écouvillon.
- Placer l'anse ou l'écouvillon dans le tube contenant les réactifs. Mélanger avec les réactifs. Retirer immédiatement l'anse ou l'écouvillon.

- Ajouter 4 gouttes de Réactif 3. Mélanger en tapant légèrement avec son doigt sur le tube.

- À l'aide d'une pipette Pasteur ajouter pour chaque groupe à tester 2 gouttes de l'extrait bactérien par ovale.

- Ajouter une goutte de Strep B latex dans le premier ovale. Ajouter une goutte de Strep C latex dans le deuxième ovale. Ajouter une goutte de Strep. G latex dans le troisième ovale. Mélanger et bercer la carte pour un maximum de 60 secondes.

6. Coagulase

Principe

Ce test sert à déterminer si la bactérie est capable de coaguler le plasma par l'action de l'enzyme coagulase.

a. en tube

Technique

- Dans un tube contenant 0,5 mL de plasma de lapin dilué, faire une suspension de la culture bactérienne en prenant, à l'aide d'une anse de platine, quelques colonies sur la gélose au sang.

- Incuber à 37°C. La réaction se produit en dedans de 3 à 4 heures. Dans le cadre des T.P. de bactériologie, la lecture se fera le lendemain.

Résultats

Réaction positive: plasma coagulé.

Réaction négative: plasma liquide.

b. sur lame

Technique

- Sur une lame propre, mettre une goutte d'eau distillée ou de saline.

- Suspendre un fort inoculum du micro-organisme à identifier (1 colonie d'une culture pure de 18-24 heures) dans la goutte d'eau ou de saline (vérifier l'autoagglutination).

- Si non autoagglutiné, mélanger le tout avec une ansée de plasma de lapin.

Réaction positive: formation d'un précipité blanc (5 à 20 secondes)

Réaction négative: aucune coagulation (précipité) entre 3 et 4 minutes.

Tout test de coagulase sur lame négatif doit être confirmé par un test de coagulase en tube.

7. Esculine

Principe

Ce test sert à déterminer l'habilité d'un micro-organisme à hydrolyser l'esculine en esculetin et glucose.

Technique

- A l'aide d'un fil de platine, inoculer une gélose sang-esculine en faisant une strie.
- Incuber à 37°C.

Résultats

Réaction positive: noircissement de la gélose autour de l'inoculum.

Réaction négative: aucun changement.

8. Fermentation des sucres

Principe

Déterminer la capacité de la bactérie à dégrader un sucre donné mis dans un milieu de base, et ce, en produisant de l'acide.

Technique

- A partir d'un bouillon de culture, ensemencer des tubes contenant différents sucres et un indicateur de pH.

- Incuber à 37°C pendant un minimum de 24 heures.

Interprétation

Réaction positive: pH acide.

Réaction négative: pH alcalin.

La couleur du milieu dépend de l'indicateur de pH.

9. Indole

Principe

Déterminer la capacité de la bactérie à former de l'indole à partir du tryptophane.

Technique

Milieu SIM ou Gillies ou MRP (pour les *Pasteurella* spp. et *Actinobacillus* spp.)

- Inoculer en piquant le fil droit au centre à une profondeur de 1,5 cm ou simplement inoculer le milieu si liquide.

- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Après incubation, ajouter 4-5 gouttes de réactif de Kovacs et agiter légèrement s'il s'agit du test en milieu liquide.

Résultats

Réaction positive: anneau rouge à la surface du milieu.

Réaction négative: anneau jaune (couleur du réactif).

10. Mobilité

Principe

Déterminer si la bactérie est mobile et si elle est mobile, conclure qu'elle est flagellée.

a.Technique de Gillies

Technique

- Inoculer en piquant le fil droit au centre en une profondeur de 1,5 cm.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Résultats

Test positif: une culture de bactéries mobiles s'éloignera de la ligne d'inoculation et se diffusera dans le milieu qui deviendra alors rose.

Test négatif: la croissance reste limitée au point d'inoculation.

b. Technique à l'état frais

Technique

- Mettre une goutte de suspension bactérienne (phase exponentielle) sur une lame ou mettre une goutte de saline sur une lame et transférer une colonie (culture de 18 heures), à l'aide d'une anse de platine, pour créer une suspension bactérienne homogène.

Résultats

Observer la suspension bactérienne au microscope optique en déplaçant le condensateur au plus bas et en diminuant le diaphragme de moitié.

Attention : ne pas confondre la mobilité bactérienne et le mouvement Brownien des particules.

11. Oxydase

Principe

Ce test permet de déterminer si un micro-organisme possède le système enzymatique (cytochrome c) lui permettant d'utiliser l'oxygène libre (O_2) comme accepteur final d'électron dans la chaîne respiratoire.

Technique (API)

- Dégager lecarré de carton imprégné du réactif de son emballage (papier en aluminium);

- A partir d'une colonie, à l'aide d'un bâtonnet en bois, transférer par rotation l'inoculum sur un coin d'un des quadrants (4 tests par quadrant);

- Attendre 20 secondes avant de déterminer s'il y a ou non changement de couleur. Toute réaction après 20 secondes ne doit pas être considérée.

Interprétation

Réaction positive: couleur pourpre

Réaction négative: pas de couleur pourpre.

12. Oxydation-Fermentation (OF)

Principe

Ce test sert à déterminer si un micro-organisme utilise les sucres par métabolisme oxydatif ou fermentaire ou s'il ne l'utilise pas.

Technique

- A partir d'une culture sur gélose et à l'aide d'un fil de platine droit, inoculer en enfonçant votre fil jusqu'à 1 mm du fond dans le milieu OF (tube étranglé contenant un sucre donné, généralement du glucose).

- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Interprétation

	Tube avec étranglement	
Résultat	Partie supérieure	Partie inférieure
Fermentation	Jaune[a]	Jaune
Oxydation	Jaune	Vert
Inerte	Vert ou bleu[b]	Vert

[a] Jaune: utilisation du sucre (acidification du milieu)
[b] Vert ou bleu: non utilisation du sucre

13. Phénylalanine désaminase (PD)

Principe

Déterminer la capacité de la bactérie de désaminer la phénylalanine en acide phénylpyruvique (A.P.P.); ceci produit l'acidification du milieu. Ce test permet de distinguer des autres genres bactériens, les membres de la tribu des *Proteeae.*

Technique

- A partir de la croissance sur gélose, recueillir un inoculum concentré pour ensemencer la pente du milieu en tube.

- Incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

- Pour la lecture du résultat, ajouter 4-5 gouttes de réactif (solution de chlorure ferrique) et osciller le tube lentement pour répandre le réactif sur toute la surface de la pente.

Résultats

Réaction positive: verdissement de la pente et du liquide.

Réaction négative: pas de changement de couleur,
demeure jaune comme la couleur du réactif.

14. Triple Sugar Iron (TSI)

Principe

Déterminer la capacité de la bactérie d'utiliser plus d'un des sucres (glucose, lactose ou sucrose), avec ou sans production de gaz, et de produire du sulfure d'hydrogène (H_2S).

Technique

- En partant d'une colonie, inoculer le culot en piquant avec un fil droit au centre puis inoculer la pente en effectuant une strie sinueuse.

- Incuber à 37°C jusqu'au lendemain.

Résultats

Fermentation du glucose seulement: culot jaune et pente rouge.

Fermentation du glucose et un des deux autres sucres (lactose ou sucrose): culot et pente jaune.

Aucun sucre dégradé: pente rouge et culot rouge ou orange.

Production de gaz: bulle(s) de gaz, milieu complètement séparé ou soulevé.

Production de H_2S: précipité noirâtre plus ou moins abondant.

15. Uréase

Principe

Déterminer si un micro-organisme a la capacité d'hydrolyser l'urée et ainsi former de l'ammoniaque, ce qui cause l'alcalinisation du milieu.

Technique (milieu de Christensen)

- A partir de la croissance sur gélose, recueillir un inoculum abondant à l'aide d'une anse de platine et ensemencer la surface de la gélose en pente en formant une strie sinueuse.
- Incuber à 37°C pendant 18-24 heures.

Résultats

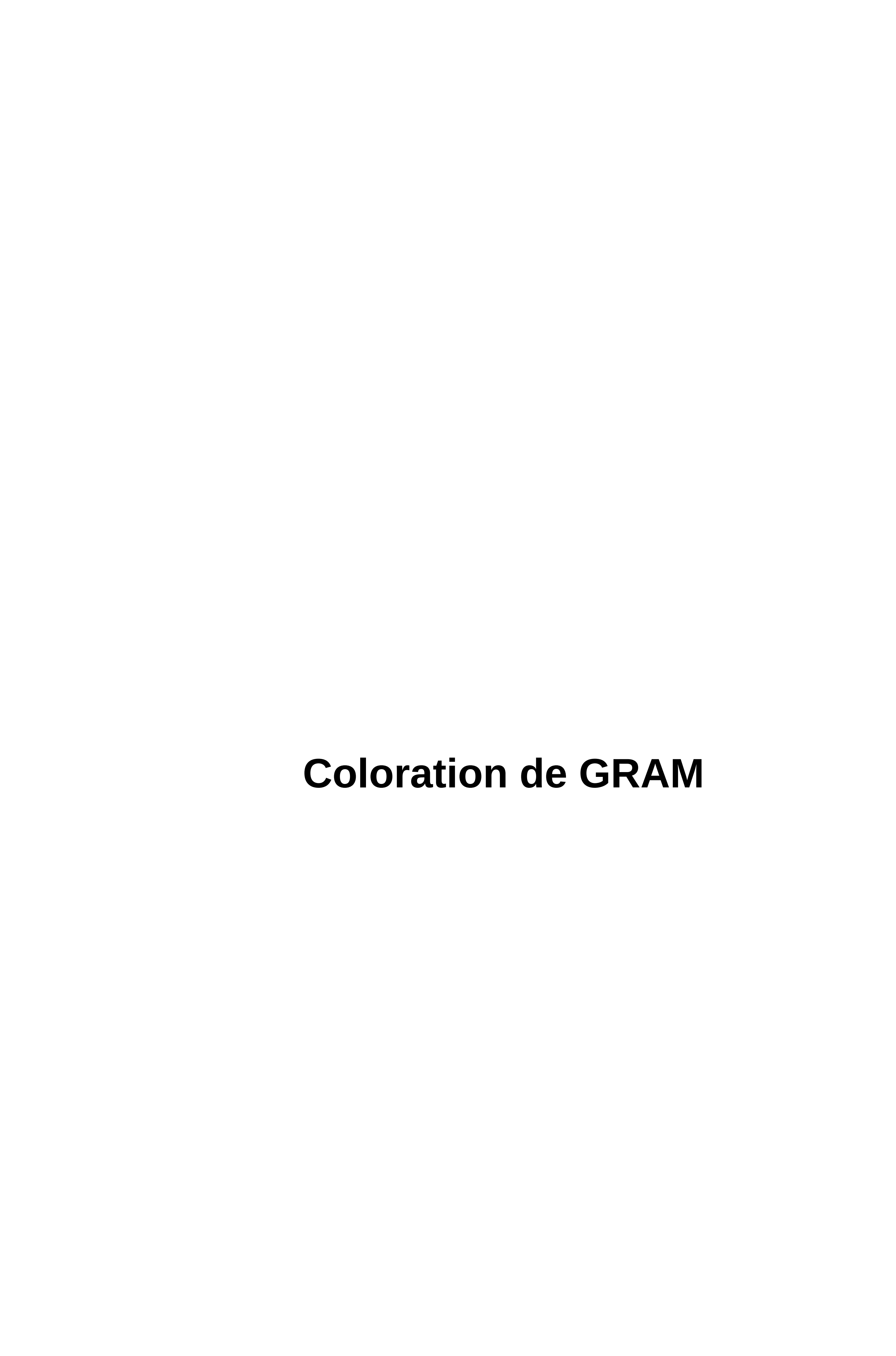
Réaction positive: couleur rose intense.
Réaction négative: couleur inchangée (légèrement jaune).

Charte d'interprétation des antibiogrammes

CHARTE D'INTERPRÉTATION DES ANTIBIOGRAMMES

Agent antibactérien	Ident. des disques	Charge du disque (µg)	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)		
			Résistant ≤	Limite	Sensible ≥
Ampicilline	AMP				
Bat G^- entériques		10	13	14-16	17
Actino. pleuropneumoniae		10	21	22-24	25
Staphylocoques		10	28	-	29
Strept. non-entérocoques		10	18	19-25	28
Entérocoques		10	16	-	17
Chloramphénicol[1]	C	30			
Autres que streptocoques			12	13 - 17	18
streptocoques			17	18-20	21
Erythromycine	E	15	13	14 - 22	23
Gentamicine	CN	10	12	13 - 14	15
Kanamycine	K	30	13	14-17	18
Pénicilline	P				
Staphylocoques		10*	28	-	29
Strept. non-entérocoques		10*	19	20 - 27	28
Entérocoques		10*	14		15
Autres (Bâtonnets à Gram négatif)		10*	11	12 - 21	22
Streptomycine	S	10	11	12 - 14	15
Sulfamides	S3	250 ou 300	12	13 - 16	17
Tétracycline	TE	30	14	15 - 18	19
Actino. pleuropneumoniae		30	25	26 - 28	29
Triméthoprime-sulfaméthoxazole	SXT	1.25/23.75	10	11 - 15	16

* Unités internationales au lieu de µ
[1] Usage interdit chez les animaux destinés à la consommation humaine.



Coloration de GRAM

COLORATION DE GRAM MODIFIÉE PAR REED

COLORANTS:

1.	Crystal violet	2,5 g/L
2.	Bicarbonate de sodium	12,5 g/L
3.	Iode	20,0 g/L
	Hydroxide de sodium (solution 1 M)	100 mL
	Dissoudre l'iode dans l'hydroxide de sodium avant d'ajouter l'eau distillée	
	Eau distillée	900 mL
4.	Alcool éthylique 95%	750 mL
	Acétone	250 mL
5.	Fuchsine basique (solution saturée dans alcool éthylique 95%)	100 mL
	Eau distillée	900 mL

TECHNIQUE :

1. Préparer un frottis sur lame de verre. Fixer à la chaleur.

2. Couvrir le frottis avec une quantité égale de crystal violet et de bicarbonate de sodium. Souffler légèrement sur la lame pour bien mélanger. Laisser en contact pendant 30 secondes.

3. Couvrir la lame avec la solution d'iode et laisser en contact pendant 30 secondes.
   Laver soigneusement avec l'eau du robinet.

4. Décolorer la lame avec le mélange d'alcool-acétone jusqu'à ce que l'alcool-acétone n'entraîne plus de colorant (5 à 10 secondes).
   Laver immédiatement à l'eau du robinet.

5. Couvrir le frottis avec la fuchsine basique (2 à 3 secondes).
   Laver à l'eau et sécher.

6. Examiner le frottis à un grossissement de 1000X.

Les milieux spéciaux

Milieu sélectif pour les staphylocoques: Mannitol Salt Agar (MSA)

But: Pour l'isolement des staphylocoques.

Principe: 1. Ce milieu contient une concentration en sel de 7,5%, ce qui inhibe la croissance de la majorité des bactéries autres que les staphylocoques.

2. Ce milieu contient du rouge de phénol et du mannitol. Si le staphylocoque fermente le mannitol, le changement de pH provoquera un jaunissement du milieu. Cette information aidera à l'identification l'espèce en cause *(Staphylococcus aureus).*

Milieu sélectif pour les streptocoques: COLUMBIA (C)

But: Pour l'isolement des streptocoques.

Principe: 1. Ce milieu contient de l'acide oxolinique, de la colistine, de la néomycine et de la polymyxine B qui permettent l'isolement de streptocoques à partir de spécimens du tractus respiratoire supérieure. Les bactéries à Gram négatif sont totalement inhibées ainsi que presque toutes les bactéries à Gram positif autres que les streptocoques.

Milieu sélectif pour les bactéries À Gram négatif: MacConkey (McC)

But: Isolement des *Enterobacteriaceae* et autres micro-organismes À Gram négatif.

Principe: 1. La présence de sels biliaires inhibe la croissance des bactéries à Gram positif.

2. La présente concentration de cristal violet est toxique pour certaines bactéries à Gram négatif et bactériostatique pour les bactéries à Gram positif.

3. Ce milieu contient aussi du lactose et du rouge neutre. Les germes, qui dégradent le lactose, forment des colonies qui intègrent le colorant. Cette réaction est due à l'action des acides, produits par la fermentation du lactose sur les sels biliaires.

Milieu sélectif pour les salmonelles: Salmonella-Shigella (SS)

But: Favoriser l'isolement de *Salmonella* spp et de *Shigella* spp.

Principe: 1. Ce milieu contient des sels biliaires et du vert brillant qui inhibent totalement la croissance des bactéries à Gram positif et, à un degré moindre, les certaines bactéries à Gram négatif.

2. Ce milieu contient du lactose et du rouge neutre. Les germes qui dégradent le lactose forment des colonies qui intègrent le colorant.

3. Ce milieu contient un sel de fer qui réagit avec le H_2S produit par certaines bactéries. Ces dernières donnent alors des colonies avec un centre noir.

N.B. Les salmonelles ne dégradent pas le lactose et donnent des colonies incolores avec ou sans un centre noirâtre.

Méthodes de travail*

* Tiré de: Cahier de T.P. en Microbiologie générale PTM 1234